دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۳، صفحه ۳۱۷ – ۳۰۷ (مرداد و شهریور ۱۳۹۳)

ISMJ 2014; 17(3): 307-317

بررسی اثر جهش‌زایی عصاره‌ی متانولی گیاه گل گاوزبان (*Echium amuenum*) با تست ایمز (Ames bioassay)

میثم موسوی [۱]، امیر جلالی [۱*]، فرزانه کیانی‌پور [۱]، امیر سیاهپوش [۲]، احمد فرج‌زاده شیخ [۳]

[۱] گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، مرکز تحقیقات سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه جندی شاپور اهواز
[۲] گروه فارماکوگنوزی، مرکز تحقیقات گیاهان داروئی و فرآورده‌های طبیعی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
[۳] گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

(دریافت مقاله: ۹۱/۵/۲۰- پذیرش مقاله: ۹۱/۷/۲۲)

چکیده

زمینه: گیاه گل گاوزبان (**Echium amuenum**) دارای آلکالوئیدهای پیرولیزیدین با اثرات شناخته شده سمیت کبدی و موتاژنیسیته می‌باشد. بر همین اساس در این تحقیق اثرات جهش‌زایی احتمالی عصاره‌ی متانولی سر شاخه‌های گلدار آن، با استفاده از تست ایمز بررسی شد.

مواد و روش‌ها: عصاره‌گیری با روش خیساندن در متانول به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. عصاره گیاه از نظر آلودگی به آفلاتوکسین **B1** و حضور اسیدآمینه هیستیدین به‌روش **TLC** مورد ارزیابی قرار گرفت. **MIC** (**minimum inhibitory concentration**) کمترین غلظت مهار رشد میکروبی) با روش رقت لوله‌ای تعیین شد. برای بررسی اثرات جهش‌زایی، از آزمون ایمز با استفاده از سویه‌ی سالمونلا تیفی موریم **TA۱۰۰**، استفاده شد. ژنوتیپ سویه با استفاده از فاکتورهای عدم سنتز هیستیدین، حضور فاکتور **R**، موتاسیون **rfa** و موتاسیون **uvrB** تأئید شد. در این تحقیق از ۴ غلظت ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (غلظت‌های کمتر از **MIC** ۰/۱ گل گاوزبان) کنترل مثبت (سدیم آزید) و کنترل منفی (متانول) در حضور و عدم حضور آنزیم‌های کبدی استفاده شد.

یافته‌ها: در ۴ غلظت بررسی، تغییر معنی‌داری در کلنی برگشتی نسبت به کنترل منفی مشاهده نشد. همچنین در حضور آنزیم‌های کبدی، تغییر معنی‌داری در تعداد کلنی‌ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، به‌نظر می‌رسد که این گیاه پرمصرف در طب سنتی، فاقد اثر موتاژنیک و نیز سمیت ژنی در مقادیر معمول مصرف است.

واژگان کلیدی: جهش زایی، تست ایمز (**Ames test**)، گل گاوزبان (**Echium amuenum**)، سالمونلا تیفی موریوم **TA100**

* اهواز، جاده گلستان، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

Email : amjalali@hotmail.com

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

مقدمه

مکانیسم‌های مختلف آسیب DNA، باعث تغییراتی در ساختار DNA و ایجاد جهش می‌شود. اغلب تغییرات سرطانی متعاقب آسیب به DNA ایجاد و ایجاد جهش حاصل می‌شوند. بنابراین ضرورت بررسی اثرات آسیب به DNA و جهش زائی ترکیبات مختلف مورد تماس و یا مصرف توسط انسان مشخص می‌شود (۱).

در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان دارویی افزایش پیدا کرده است که ناشی از اعتقاد به بی‌خطر و مؤثر بودن فرآورده‌های گیاهی است (۴-۲). اگر چه مصرف بسیاری از داروهای گیاهی بی‌خطر می‌باشد، اما بایستی در نظر داشت که مصرف فرآورده‌های گیاهی ممکن است همراه با اثرات سمی باشد. بی‌خطر بودن مصرف گیاه در زنان باردار، حائز اهمیت بیشتری است (۲، ۶-۴).

مطالعات اخیر نشان داده است که برخی از ترکیبات گیاهی مانندسافرول (Safrol) موجود در گیاه *Sassafras albidum* و سیکاسین (Cycasin) موجود در گیاهان خانواده‌های Cycadaceae و Zamiaceae و آلکالوییدهای پیرولیزیدین موجود در گیاهان خانواده‌های گاوزبان (Boraginaceae)، کاسنی (Asteraceae) و ارکیده (Orchidoceae) دارای ترکیبات سمی با اثرات سرطان‌زائی می‌باشند (۱۳-۶).

گل گاوزبان با نام علمی Echiumamuenum از خانواده Boraginaceae است که بومی نیمکره غربی، ایران و منطقه قفقاز می‌باشد. این گیاه دارای ترکیبات مختلف از جمله فلاونوئیدها، ساپونین، استرول و ترپنوئیدهای غیراشباع می‌باشد (۱۴). این گیاه از گیاهان دارویی مهم طب سنتی ایران می‌باشد (۱۵ و ۱۶). فلاونوئیدها و مشتقات فلاونوئیدی موجود در این گیاه قادرند که به رسپتورهای مرکزی بنزودیازپینی متصل و اثرات آرامبخشی و ضداضطراب شبیه بنزودیازپینی نشان دهند (۱۷). از گذشته‌های دور،گل‌های خشک این گیاه به‌صورت دم کرده در طب سنتی کشورمان به‌عنوان آرام‌بخش، مدر، درمان سرماخوردگی، پنومونی و گلودرد استفاده فراوانی داشته است. با توجه به مقبولیت عمومی این گیاه در ایران، تقریباً در بسیاری از بیماری‌ها مخصوصاً مشکلات عصبی و سرماخوردگی اولین انتخاب داروی گیاهی به‌حساب می‌آید (۱۶ و ۱۸).

برخی از انواع گاوزبان از قبیل گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis*) که در سرماخوردگی استفاده می‌شود.مصرف این گیاه به علت داشتن آلکالوئیدهای پیرولیزیدین با سمیت شناخته شده کبدی، محدودیت مصرف دارد (۹ و ۱۹). وجود مقادیر کم آلکالوئیدهای پیرولیزیدین در گل گاوزبان ایرانی ثابت شده است (۲۰). آلکالوئیدهای پیرولیزیدین همچنین دارای خواص موتاژنی و مخرب بر DNA نیز می‌باشند. آلکالوئیدهای پیرولیزیدینی قادرند که به ترکیبات پیرولی آلکیله کننده تبدیل و با اتصال به DNA، RNA و پروتئین سلول‌های کبدی موجب سیروز، آسیت و حتی سرطان کبد شوند (۲۱ و ۲۲).

بر همین اساس در پژوهش اخیر امکان ایجاد سمیت ژنی عصاره متانولی گل گاوزبان با استفاده از تست Ames مطالعه شد تا سلامت مصرف دم کرده‌ی این گیاه در دوزهای معمول مصرف بررسی شود.

مواد و روش‌ها

گیاه گل گاوزبان در مدت یک ماه از محل‌های رویش آن در مناطق رامهرمز و ایذه استان خوزستان تهیه و توسط استاد گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دکتر امیر سیاهپوش تأیید شد. باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰ از گروه میکروب‌شناسی دانشگاه شاهد تهیه و در محیط نوترنیت براث (Nutrient Brath) کشت و آزمایش‌های تأیید سوش بر روی آن انجام شد.

آزمون‌های تأیید سوش TA۱۰۰

سویه‌ی باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰ می‌بایست واجد موتاسیون rfa و موتاسیون uvrB بوده و جهت رشد نیازمند اسید آمینه‌ی هیستیدین و اسید آمینه بیوتین می‌باشد (۲۳). این سویه‌ی آزمایشگاهی، در یکی از ژن‌های اپران هیستیدین، دارای جهش بوده و برای رشد خود به هیستیدین نیاز دارد.

نیازمندی به هیستیدین

دو سری لوله‌ی آزمایش حاوی محیط کشت مایع LB broth استفاده شد. سری اول حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیستیدین، ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیوتین و سری دوم حاوی تنها ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیوتین و فاقد هیستیدین بودند. به هر کدام از لوله‌ها با پیپت استریل ۰/۲ میلی‌لیتر از سویه‌ی کشت شده افزوده شد. لوله‌ها برای ۲۴ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده و نتایج بررسی شد (۲۳).

نیازمندی به بیوتین

دو سری لوله‌ی آزمایش حاوی محیط کشت مایع LB broth استفاده شد. سری اول واجد ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیستیدین و ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیوتین و سری دوم حاوی تنها ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از هیستیدین و فاقد بیوتین بودند. به هر کدام از لوله‌ها با پیپت استریل ۰/۲ میلی‌لیتر از سویه‌ی کشت شده افزوده شد. لوله‌ها برای ۲۴ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۲۳).

بررسی حضور فاکتور R

از کشت یک شبه تازه سویه باکتری بر سطح پلیت آمپی‌سیلین گسترش مناسبی تهیه و به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. رشد باکتری در پلیت آمپی‌سیلین مؤید حضور فاکتور R در سویه بود.

بررسی موتاسیون rfa

۰/۲ میلی‌لیتر از سویه‌ی کشت شده با پیپت استریل به تعدادی پلیت منتقل شد. مقداری از محیط کشت LB agar حاوی ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیستیدین و ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیوتین، به هر پلیت اضافه و تکان داده شد. پس از انجماد کامل محیط در شرایط استریل، بر روی هر کدام از دیسک‌های کاغذ صافی استریل، ۱۰ میکرولیتر از محلول کریستال ویولت با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تزریق و پس از خشک شدن دیسک کاغذی، در ۵ نقطه از هر پلیت گذاشته شد. پلیت‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه و دمای ۳۷ درجه قرار داده و هاله‌ی شفاف اطراف دیسک که نشانگر عدم رشد سلول‌ها و جهش Rfa می‌باشد، بررسی شد (۲۳).

بررسی موتاسیون uvrB

۰/۲ میلی‌لیتر از سویه‌ی باکتری با پیپت استریل به تعدادی پلیت منتقل شد. مقداری از محیط کشت LB agar حاوی ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیستیدین و ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیوتین به هر پلیت اضافه شد. پس از انعقاد کامل محیط، با یک تکه مقوا نیمی از پلیت پوشانده و نیم دیگر پلیت از فاصله‌ی ۳۰ سانتی‌متری به‌مدت ۸ تا ۱۰ ثانیه تحت اثر لامپ UV با طول موج کوتاه قرار داده شد. در ادامه پلیت‌ها

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در گرم‌خانه قرار داده شد. عدم رشد در اطراف قسمت اشعه دیده، نشان دهنده‌ی جهش uvrB و تأیید سویه‌ی TA۱۰۰ می‌باشد (۲۳).

اطمینان از عدم حضور هیستیدین در عصاره با انجام کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

۲ میلی‌گرم عصاره خشک گل گاوزبان در ۲ میلی‌لیتر متانول حل شد. محلول استاندارد هیستیدین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز تهیه شد. با لوله‌ی مویین از محلول نمونه و استاندارد بر روی صفحه‌ی سیلیکاژل پشت آلومینیومی (۵×۲۰ سانتی‌متر) لکه‌گذاری و در تانک فاز متحرک (n–بوتانل ۶۰: اسیداستیک ۱۵: آب مقطر ۲۵) قرار داده شد. با طی ۱۵ سانتی‌متر مسیر حلال، کروماتوگرام از تانک بیرون و پس از خشک شدن کامل، محلول نانهیدرین در استون با غلظت ۰/۵ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر به‌عنوان معرف اسپری شد (۲۴ و ۲۵).

تعیین MIC گل گاوزبان

با توجه به حلالیت نمونه در آب (عصاره متانولی)، از روش رقت لوله‌ای برای اندازه‌گیری MIC (کمترین غلظت مهار رشد میکروبی) استفاده شد. ۸ لوله آزمایش استریل انتخاب و در ۵ لوله به‌ترتیب غلظت‌های ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ و ۲/۵ (میلی‌لیتر محیط کشت/ میلی‌گرم عصاره خشک) ازعصاره گیاه تهیه شد. دو لوله دیگر به‌عنوان کنترل منفی و لوله فاقد عصاره گیاهی به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. محیط کشت مورد استفاده آبگوشت LB broth غنی شده با هیستیدین و بیوتین بود. به پنج لوله اول حاوی غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی (۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ و میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۲/۵) و کنترل مثبت، میلی‌لیتر ۰/۱ از کشت یک شبه‌ی سوی باکتری TA۱۰۰ اضافه شد. لوله‌های فوق به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و کمترین غلظت مربوط به لوله فاقد کدورت، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد (۲۳).

ردیابی آفلاتوکسین B1 در عصاره گیاهی

برای ردیابی آفلاتوکسین از کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. فاز متحرک شامل کلروفرم ۵/۵، استون ۱۲/۵، آب مقطر ۲/۵ بود و محلول آفلاتوکسین B1 با غلظت میکرو گرم در میلی لیتر میکرو گرم بر میلی لیتر به‌عنوان محلول استاندارد در نظر گرفته شد. لکه‌ها با لامپ UV (۳۶۶ nm) ملاحظه شد (۲۴). غلظت مورد نظر در حد تشخیص TLC بوده و لکه استاندارد در زیر نور UV مشاهده شد.

تهیه محلول‌های مورد نیاز

با توجه به غلظت MIC گیاه گل گاوزبان که ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، ۴ محلول با غلظت‌های کمتر یا مساوی ۰/۱ غلظت MIC تهیه شد (غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متانول). محلول سدیم آزید با غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم (کنترل مثبت) و متانول (کنترل منفی) و ۶ لوله جهت استریل شدن، ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. آزمایش یک بار بدون و بار دیگر در حضور آنزیم‌های کبدی انجام شد.

انجام تست بدون حضور آنزیم‌های کبدی

به ۱ لیتر از LB agar ۰/۰۸گرم هیستیدین و ۰/۱۲ گرم بیوتین افزوده و اتوکلاو شد. ۱۲ عدد پلیت (از هر غلظت ۲ پلیت، ۲ پلیت برای کنترل مثبت و ۲ پلیت برای کنترل منفی) آماده شد. برای هر غلظت، ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره به پلیت اضافه و در سطح پراکنده شد. از لوله‌ی حاوی باکتری با ۰/۵ مک فارلند به‌غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ به‌میزان ۰/۲ میلی‌لیتر به پلیت اضافه و پراکنده شد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

در کنترل مثبت ۰/۵ میلی‌لیتر سدیم آزید و در کنترل منفی ۰/۵ میلی‌لیتر متانول به همین ترتیب به پلیت‌ها (هر کدام ۲ پلیت) اضافه شد (۲۴ و ۲۶). بنابراین ۱۲ پلیت به‌صورت وارونه به‌مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. برای اطمینان از صحت و دقت بررسی، مطالعه سه بار در سه روز متوالی انجام شد (۳۶ پلیت). نتایج در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱) نتایج انجام تست ایمز با چهار غلظت عصاره گیاه گل گاوزبان (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بدون حضور آنزیم‌های کبدی (آزمایش‌ها سه بار تکرار شده است)

	میلی‌لیتر/میلی‌گرم	تکرار ۱		تکرار ۲		تکرار ۳			
	غلظت میلی‌لیتر/میلی‌گرم	ظرف۱	ظرف۲	ظرف۱	ظرف۲	ظرف۱	ظرف۲	میانگین±انحاف‌معیار	فاکتور القا (IF)±انحاف‌معیار
عصاره گل گاوزبان	C1(۰/۲۵)	۹۳	۹۵	۸۸	۹۷	۹۴	۹۰	۳/۳۱±۹۷/۸۳	۰/۰۶±۱/۰۷
	C2(۰/۵)	۷۹	۹۵	۹۹	۹۷	۸۹	۹۳	۶/۸۷±۱۹/۱۶	۰/۱۱±۱/۰۵
	C3(۰/۷۵)	۹۰	۸۸	۹۷	۱۰۰	۹۴	۸۶	۴/۹۶±۹۱/۶	۰/۰۸±۱/۰۵
	C4(۱)	۹۳	۹۵	۱۰۲	۹۴	۹۱	۹۷	۳/۸۷±۹۵/۳	۰/۰۸±۱/۱۰
کنترل	Control+(NaN3۰/۰۱)	۳۹۰	۴۳۰	۳۸۰	۴۲۰	۴۷۰	۳۷۰	۴۰۱/۶±۷۴/۸	۴/۳۶±۰/۳۷
	Control (methand)	۹۳	۹۰	۸۵	۹۴	۷۹	۸۱	۸۶/۶±۵/۸۸	۱

شمارش کلنی‌ها و IF به‌صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است (Mean±SD).

انجام تست در حضور آنزیم‌های کبدی

این مرحله دقیقا شبیه به انجام تست در صورت عدم حضور آنزیم‌های کبدی است با این تفاوت که در مرحله‌ی اول به ۱ لیتر از LB agar بعد از افزودن ۰/۰۸ گرم هیستیدین و ۰/۱۲ گرم بیوتین ۲۰ میلی‌لیتر از مخلوط S۹ تازه تهیه شده اضافه شد. برای تهیه S۹ از کبد موش صحرایی (rat) استفاده شد. یک موش صحرایی نر با وزن تقریبی ۲۵۰ گرم انتخاب و به‌مدت ۵ روز، روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از آمپول فنوباربیتال داخل صفاقی تجویز شد. در روز ششم کبد موش جدا و با محلول سرد ۰/۱۵KCl مولار شستشو داده شد. کبد هموژن شده در دستگاه سانتریفوژ با ۷۸۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. قسمت رویی لوله‌های سانتریفوژ (فراکسیون S9) به لوله‌های استریل منتقل شد. تمام مراحل در شرایط استریل و در کنار شعله انجام شد. نتایج تست در حضور آنزیم‌های کبدی جدول ۲ آورده شده است (۲۳).

جدول ۲) نتایج انجام تست با چهار غلظت عصاره گیاه گل گاوزبان (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با حضور آنزیم‌های کبدی (آزمایش‌ها سه بار تکرار شده است)

	غلظت میلی‌لیتر/ میلی‌گرم	تکرار ۱		تکرار ۲		تکرار ۳			
	غلظت میلی‌لیتر/میلی‌گرم	ظرف۱	ظرف۲	ظرف۱	ظرف۲	ظرف۱	ظرف۲	میانگین±انحراف معیار	فاکتور القا (IF)±انحاف‌معیار
عصاره گل گاوزبان	C1(۰/۲۵)	۱۰۰	۹۲	۸۶	۹۳	۸۷	۹۸	۹۷/۶۶±۵/۶۴	۱/۰۳±۰/۰۹
	C2(۰/۵)	۸۳	۹۳	۹۸	۹۶	۹۹	۸۹	۹۳±۶/۰۹	۱/۰۴±۰/۱
	C3(۰/۷۵)	۹۴	۱۰۴	۹۶	۸۹	۹۰	۹۵	۹۴/۶۶±۵/۳۵	۱/۰۵±۰/۱
	C4(۱)	۹۹	۹۰	۸۹	۹۶	۹۵	۹۸	۹۴/۵±۴/۱۳	۱/۰۵±۰/۸
کنترل	Control+(NaN3۰/۰۱)	۴۱۰	۳۸۰	۴۳۰	۳۹۰	۴۲۰	۴۰۵	۴۰۵/۸±۱۸/۵۵	۴/۵۳±۰/۴۳
	)methand(Control	۹۷	۹۱	۸۴	۹۳	۹۲	۸۰	۸۹/۵±۶/۲۸	۱

شمارش کلنی‌ها و IF به‌صورت میانگین± انحراف معیار نشان داده شده است (Mean±SD).

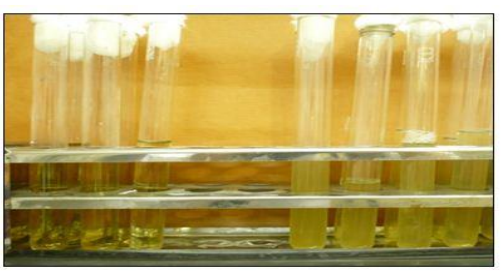
[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

یافته‌ها

تایید ژنوتیپ سویه‌ی باکتری

نیازمندی به هیستیدین و بیوتین

لوله‌های حاوی هیستیدین و بیوتین پس از ۲۴ ساعت کاملاً کدر شدند که نشان‌دهنده رشد میکروب می‌باشد. در حالی که لوله‌های حاوی فقط هیستیدین و یا فقط بیوتین، همچنان شفاف بوده و رشد میکروب در آن مشاهده نشد (شکل ۱).



شکل ۱) تأیید ژنوتیپ سویه باکتری TA 100 (لوله‌های سمت راست تیره‌تر (رشد باکتری) و لوله‌های سمت چپ عدم رشد باکتری دیده می‌شود).

نتیجه بررسی حضور فاکتور R

حضور فاکتور R با مشاهده مقاومت به آمپی‌سیلین تأیید شد.

نتیجه بررسی موتاسیون rfa

هاله عدم رشد در اطراف تمامی دیسک‌های حاوی کریستال ویوله تشکیل شد. میانگین قطر هاله عدم رشد در حدود ۱۴ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

نتیجه بررسی موتاسیون uvrB

باکتری در قسمت تحت تأثیر اشعه UV، رشد نداشت در حالی که در قسمت فاقد تابش پلیت، رشد کافی مشاهده شد.

بررسی حضور هیستیدین در عصاره گیاهی

پس از اسپری معرف نانهیدرین، ظهور لکه‌های مربوط به استاندارد هیستیدین و نمونه‌ی عصاره بر روی صفحه کروماتوگرام مشاهده شد. با مقایسه فاکتور بازداری(Rf) هیستیدین (Rf His=۰/۲۲) با نمونه، عدم وجود هیستیدین تأیید شد (شکل ۲).

شکل ۲) بررسی حضور هیستیدین در عصاره گیاهی با استفاده از معرف نانهیدرین (لکه‌ی استاندارد هیستیدین و نمونه عصاره بر روی صفحه کروماتوگرام مشاهده می‌شود).

نتایج تعیین MIC نمونه عصاره گیاهی

MIC عصاره متانولی گل گاوزبان برای سویه‌ی باکتری TA۱۰۰ به‌میزان میلی‌لیتر/میلی‌گرم ۱۰ می‌باشد.

ردیابی آفلاتوکسین در گیاه

کاغذهای TLC در زیر اشعه‌ی UV قرار داده شد. با توجه به اینکه آفلاتوکسین در طول موج ۳۶۶nm در زیر لامپ UV فلورسانس آبی دارد، هیچ اثری از فلورسانس آبی مشاهده نشد. به همین علت، آفلاتوکسین در گیاه مشاهده نشد.

تجزیه و تحلیل آماری

محاسبه‌ی آمار توصیفی از جمله میانگین، SD و مقایسه پارامترهای مورد مطالعه بین گروه‌های نمونه و کنترل منفی بنا به ضرورت با استفاده از آزمون آماری paired T-test با سطح معنی‌دار (P<۰/۰۵) انجام شد.

بحث

گیاه گل گاوزبان مصرف زیادی در ایران دارد. با توجه به کاربرد بسیار زیاد این گیاه، تصمیم گرفته

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

شد که خاصیت احتمالی جهش‌زایی و تغییرات ژنتیکی این گیاه با تست ایمز بررسی شود. این تست برای بررسی توانایی احتمالی ایجاد جهش در صورت مواجه با مواد و ترکیبات مختلف استفاده می شود.

با توجه به امکان سمیت کبدی گیاهان دارای آلکالوئیدهای پیرولیزیدین و نیز متابولیسم کبدی این آلکالوئیدها، در مطالعه حاضر اثرات سمیت ژنی در حضور آنزیم‌های کبدی نیز انجام شد. علت استفاده از عصاره متانولی در این تحقیق، اطمینان از استخراج کامل آلکالوئیدهای پیرولیزیدین به‌وسیله متانول است. این آلکالوئیدها دارای حلالیت بسیار کم در آب هستند (۲۱). با توجه به مشابهت متابولیسم روده‌ای و کبدی انسان با موش (۲۶ و ۲۷) در این مطالعه از آنزیم‌های کبدی موش، استفاده شد. با توجه به اینکه در ایران از سرشاخه‌های گل‌دار گل گاوزبان به‌عنوان دارویی آرام‌بخش و ضد سرماخوردگی مصرف می‌شود، در این مطالعه از عصاره سرشاخه‌های گل دار این گیاه استفاده شد.

باکتری‌ها به‌دلیل هزینه کم و حساسیت زیاد در سنجش و تشخیص سرطان‌زایی مواد مشکوک در آزمون ایمز استفاده می‌شوند. در هنگام انجام این تست، تعداد زیادی باکتری (حدود ۵×۱۰^{۸} باکتری در هر ظرف) در معرض ماده موتاژن قرار داده و با توجه به انجام سریع و به صرفه آن، از آزمون‌های مؤثر در ارزیابی سریع مقدماتی مواد مختلف از جمله عصاره‌های گیاهی می‌باشد (۳۰-۲۸).

در این آزمون از باکتری سالمونلا تیفی موریوم سویه TA۱۰۰ که حساسیت زیادی در شناسایی میزان جهش‌زایی مواد مختلف دارد، استفاده شد. این سویه دارای موتاسیون hisG۴۶ در ژن hisG (ژن کد کننده بیوسنتز هیستیدین) می‌باشد و مواد موتاژنی را که سبب استخلاف جفت باز در یکی از جفت‌های G-C می‌شوند را شناسایی می‌کند. TA۱۰۰ همچنین دارای فاکتور R (فاکتور مقاومت به آمپی‌سیلین) می‌باشد.

وجود موتاسیون rfa سبب نفوذ مولکول‌های درشت به داخل باکتری و افزایش قدرت ارزیابی مواد موتاژن در این سویه می‌شود. با توجه به موتاسیون uvrB، این سویه در مقابل اشعه UV قادر به رشد نخواهد بود (۲۳ و ۳۱).

در این تحقیق پس از طی مراحل مختلف کشت، جهت آنالیز داده‌ها، ابتدا میانگین کلنی‌های برگشتی مربوط به هر غلظت نسبت به میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی پلیت‌های کنترل مقایسه شد. فاکتور القاء یا فاکتور IF (Induction Factor) بیانگر نسبت کلنی‌های برگشتی ایجاد شده در پلیت‌های حاوی نمونه به پلیت کنترل منفی می‌باشد. یک ماده، زمانی موتاژن محسوب می‌شود که علاوه بر آنکه فاکتور IF آن ۲ یا بیشتر از ۲ باشد، تغییر در تعداد برگشتی‌ها نیز متناسب با غلظت بوده و اثر وابسته به دوز داشته باشد. فاکتور بین ۱/۷ و ۱/۹ همراه با اثر وابسته به دوز نشان‌دهنده اثر ضعیف موتاژنی است و اگر فاکتور مذکور کمتر از ۱/۶ باشد، ماده‌ی مورد نظر موتاژن یا دارای سمیت سلولی نمی‌باشد (۳۴-۳۲).

با انجام TLC، از عدم حضور هیستیدین در عصاره گیاه اطمینان و سوش TA۱۰۰ تأیید شد. در ادامه مشخص شد که این گونه دارای فاکتور R، موتاسیون rfa و موتاسیون uvrB است. انجام آزمایش در حضور و نیز در عدم حضور آنزیم‌های کبدی با شمارش تعداد کلنی‌های برگشتی و نیز بررسی فاکتور القایی (IF) نشان داد که IF در تمام غلظت‌ها کمتر از ۱/۶ می‌باشد. آزمون paired T-test، ارتباط

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

معنی‌داری بین غلظت‌های استفاده شده و افزایش تعداد کلنی‌های نمونه نسبت به کنترل منفی، نشان نداد. با توجه به نتایج مشخص می‌شود که گیاه گل گاوزبان در غلظت‌های مختلف دارای اثر موتاژنی بر روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA۱۰۰ نمی‌باشد (۳۴-۳۲).

این گیاه دارای ترکیبات موسیلاژ، فلاونوئید، آنتوسیانین با آگلیگون دلفینیدین و سیانیدین و مقدار اندک آلکالوئید پیرولیزیدینی است (۳۵). مطالعات نشان می‌دهد که ترکیبات مختلف فلاونوئید در گیاهان دارای پتانسیل قوی ممانعت از ایجاد موتاژنسیته ترکیبات موتاژن (۳۶) مانند آمین‌های هتروسیکلیک (۳۵) می‌باشد. همچنین ترکیبات پلی‌فنل گیاهان، دارای یک نقش دوگانه محافظتی در کاهش خاصیت کارسینوژنیسیتی، از طریق کاهش فراهمی زیستی کارسینوژن‌ها و مداخله با بیوترانسفورماسیون کبدی هستند (۳۶). بر همین اساس می‌توان پیشنهاد کرد که احتمالا ترکیبات فلاونوئید و آنتوسیانین‌ها گیاه گل گاوزبان قادر به ممانعت از بروز احتمالی اثر موتاژنیسیته آلکالوئیدهای پیرولیزیدین هستند. چهار آلکالوئید پیرولیزیدن عمده شناسائی شده در این گیاه، شامل اکیمیدین ۱ و ایزومر آن (echimidine isomer II، echimidine I)، 7-angeloyl retronecine III و7-tigloyl retronecine IV است (۲۰). در بررسی موتاژنیسیته ۱۰ ترکیب فلاونوئید کوئرستین (Quercetin)، ۵ و ۳ هیدروکسی فلاون (5-hydroxyflavone، 3-hydroxyflavone) فلاون (flavones)، گالانژین (Galangin)، کریسین (Chrysin)، فیستین (Fisetin)، لوتئولین (Luteolin) و کامپفرول (Kaempferol) مشخص شد که ترکیب کوئرستین از طریق فعال شدن متابولیک در کبد (حضور عصاره کبدی) قادر به ایجاد موتاژنیسیته در سوش‌های ۹۸، ۱۰۰ و ۱۰۲ TA است. کامپفرول و گالانژین تنها بر روی سوش TA۹۸ موتاژن بودند (۳۶).

با توجه به احتمال فعال‌سازی متابولیک برخی ترکیبات این گیاه در حضور عصاره کبدی، آزمایش در حضور عصاره کبدی نیز انجام شد که نشان‌دهنده نتایج مشابه با عدم حضور عصاره بود. در تحقیق حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که مصرف گیاه گل گاوزبان، تغییری در ژن ایجاد نمی‌کند و به‌عبارتی باعث سمیت ژنی نمی‌شود.

با توجه به مصرف گسترده گیاهان داروئی در سطح جامعه که اغلب بدون تجویز گروه‌های متخصص صورت می‌گیرد، بررسی اثرات سمی احتمالی گیاهان داروئی پر مصرف طب سنتی ایران از جمله اثرات ژنی پیشنهاد می‌شود.

سپاس و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه آقای میثم موسوی، دانشجوی داروسازی استخراج شده است. این طرح در مرکز تحقیقات سم‌شناسی تصویب اولیه و در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه جندی شاپور تصویب نهائی و در گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سم‌شناسی اجراء شد. بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات سم‌شناسی، پرسنل محترم دانشکده پزشکی و داروسازی علوم پزشکی جندی شاپور صمیمانه سپاس‌گزاری می‌شود.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

References:

1.Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J 2003; 17: 1195-214.
2.Shirkani A, Mozaffari M, Zarei M. Antimicrobial effects of 14 Medicinal plant speices of Dashti in Bushehr province. ISMJ 2014; 17: 49-57.
3.Gardiner P, Kemper KJ, Legedza A, et al. Factors associated with herb and dietary supplement use by young adults in the United States. BMC Complement Altern Med 2007; 7: 39.
4.Ernst E. Systematic reviews of herbal medicines. Am J Med 2004; 117: 533.
5.Seawright AA. Directly toxic effects of plant chemicals which may occur in human and animal foods. Nat Toxins 1995; 3: 227-32.
6.Ernst E. Risks of herbal medicinal products. Pharmacoepidemiol Drug Saf 2004; 13: 767-71.
7.Rietjens IM, Boersma MG, Van derWoude H, et al. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. Mutat Res 2005; 574: 124-38.
8.Mei N, Guo L, Liu R, et al. Gene expression changes induced by the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in liver of Big Blue rats. BMC Bioinformatics 2007; 8: S4.
9.Fu PP, Xia Q, Lin G, et al. Pyrrolizidine Alkaloids-Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms. Drug Metab Rev 2004; 36: 1-55.
10.Montbriand MJ. Herbs or natural products that may cause cancer and harm part four of a four-part series. Oncol Nurs Forum 2005; 32: E20-9.
11. Woo Y, Lai D, Arcos J, Argus M. Safrole, estragole and related compounds. In: Arcos JC, Argus MF, Woo Y, edithors. Chemical Induction of Cancer. New York: Springer-Verlag; 1988: p. 267.
12.Birdsley MB. A brief description of the cycads. Fed Proc 1972; 31: 1467-9.
13.Louw WK, Oelofsen W. Carcinogenic and neurotoxic component in the cycad Encephalartos altensteinii Lehm. (familyZamiaceae). Toxicon 1975; 13: 447-52.
14.Salehzade A. Evalution of different species of Borago available in market and comparison with standard species[dissertation]. Isfahan: Isfahan Univ., 1990.
15.Zargari A, edithor. Medical plants. vol 3. Tehran: Tehran University Publications; 1996: p. 513-38
16.Hooper D, edithor. Useful plants and drugs of Iran and Iraq. Chicago: Field Museum of Natural History: 1937: p. 115.
17.Medina JH, Viola H, Wolfman C, et al. Overview-Flavonoids a new family of benzodiazepine receptor ligands. Neurochem Res 1997; 22: 419-25
18.Amin Gh, edithor. Popular medicinal plants of Iran. Tehran: Iranian Research Institute of Medicinal Plants: 1991.
19.Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD, edithors. Herbal Medicines. London: The Pharmaceutical Press: 1996: p. 49-87.
20.Mehrabani M, Ghannadi A, Sajjadi E, et al. Toxic pyrrolizidine alkaloids of Echium amoenum Fisch &Mey. DARU 2006; 14: 122-7.
21.Mattocks AR, edithor. Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. Florida: Academic Press: 1986: p. 4019-27.
22.Brown AP, Dinger N, Levine BS. Stress produced by gavage administration in rat. Contemp Top Lab Anim Sci 2000; 39: 17-21.
23.Maron DM, Ames BN. Revised methods for salmonella mutagenicity test. Mutat Res 1983; 113: 173-215.
24.Fazli-Bazzaz BS, Izadyar A. Evaluation of the anti- mutagenic fractions of the extract Salivia leriifolia. J Basic Med Sciences 2001; 4: 241-50.
25.Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975; 3: 347-64.
26.Ballantyne B, Marrs T, Syversen T, edithors. General and Applied Toxicology. Vol 1-3. New York: Groves Dictionary INC: 1999: p. 1756-62.
27.Hayes AW, edithor. Principles and methods of toxicology. New York: Reven Press: 1994: p. 420-1.
28.Mohn GR. Bacterial systems for carcinogenicity testing. Mutat Res 1981; 87: 191-210.
29.Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutat Res 2000; 455: 29-60.
30.Gee P, Maron DM, Ames BN. Detection and classification ofmutagens: a set of base-specific Salmonella tester strains. Proc Nat

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

Acad Sci U S A 1994; 91: 11606-10.
31.Barnes W, Tuley E, Eisenstadt E. Base-sequence analysis of His+ revertants of the hisG46 missense mutation in Salmonella typhimurium. Environmental Mutagenesis 1982; 4: 297.
32.Willi J, edithor. The salmonella typhimutium reverse Mutation Assay. united states Environmental protection Aganey. Health Effects tests Guidelines: 1996: p. 219.
33.United States Environmental Protection Agency. Health Effects Tests Guidelines: OPPTS 870.5265, The Salmonella typhimurium Reverse Mutation Assay EPA712-C-96-219. 1996.
34.Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline for the Testing of Chemicals: Bacteria Reverse Mutation Test Guideline 1997: p. 471.
35.Bear WL, Teel RW. Effects of citrus flavonoids on the mutagenicity of heterocyclic amines and on cytochrome P450 1A2 activity. Anticancer Res 2000; 20: 3609-14.
36.Resende FA, Vilegas W, Dos Santos LC, et al. Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test. Molecules 2012; 17: 5255-68.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]

ISMJ 2014; 17(3): 307-317

Original Article

Assessing Mutagenicity of Methanolic Exteract of Borage Flower *(Echium amuenum*) Using Ames Bioassay

M. Moosavi [1], A. Jalali [1], F. Kianipour [1], A. Siahpoosh [2], A. Farajzadeh-Shikh [3]*

[1] Deptartment of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy and Toxicology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical sciences, Ahvaz, IRAN
[2] Deptartment of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Medicinal Plants, Natural Products Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical sciences, Ahvaz, IRAN
[3] Deptartment of Microbiology, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Scineces, Ahvaz, IRAN.

(Received 10 Agu, 2012 Accepted 13 Oct, 2012)

Abstract

Background: pyrrolizidine alkaloids have been isolated from *Echium amuenum*. These alkaloids knowing as hepatotoxic, damage the liver. Mutagenicity of pure pyrrolizidine alkaloids has been identified. Thus, the mutagenic effect of the methanolic flower extract was tested using Amest test.

Materials and Methods: The long maceration process (for 48 hrs) is carried out in order to extract all constitutes. Thin layer chromatography (TLC) method was used to evaluate aflatoxin B1 contamination and histidine amino acid presence. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined with the dilution method. Salmonella typhimurium strain TA100 was used to determination of mutagenicity. The genotype was confirmed by using histidine requirement, R- factor presence, rfa and uvrB mutations tests. The mutagenicity assay was performed by four extract concentrations (0.25, 0.5, 0.75 and 1mg/ml). Sodium azide (NaN_3) and methanol were used as the mutagens (positive control) and negative control, respectively in the absence or presence of liver-metabolizing enzymes.

Results: The data indicate that *Echium amuenum* has not significant mutagenic activity against negative control. The presence of liver-metabolizing enzymes did not exhibit a significant change against the properties of extract.

Conclusion: It seems that this extensive used plant in traditional medicine, doesn't contain mutagenic or genotoxic effect in usual doses.

Key word: Mutagenicity, Ames test, *Echium amuenum*, *Salmonella typhimurium* strain TA 100.

**Address for correspondence*: Department of Pharmacology and Toxicology, Toxicology Research Center and School of Pharmacy, Ahvaz Jundisahpur University of Medical Sciences, Ahvaz, IRAN, E-mail: amjalali@hotmail.com

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-09-13]